PATENTS – TRADE MARKS – DESIGNS

OFFICE KIRKPATRICK

ESTABL. 1852
S.P.R.L.

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

SQUARE DE MEEÛS 4
B-1040 BRUSSELS
BELGIUM

Le 24 mai 1991.

Ministère des Affaires Economiques
Office de la Propriété Industrielle
Bruxelles.

OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
24 -5- 1991
237727

Messieurs,

re: Brevet européen No 190050
du 30 janvier 1986.
VESTAR, INC.

La mention de la délivrance de ce brevet européen a été publiée au Bulletin Européen des Brevets du 15 mai 1991.

Afin d'assurer la protection en Belgique et conformément à l'article 65 de la Convention de Munich, il y a lieu de déposer une traduction du fascicule du brevet européen au Bureau des Brevets.

Je vous remets à cet effet un pouvoir ainsi qu'un exemplaire de cette traduction.

Je vous remercie de bien vouloir me confirmer la publication de cette traduction et vous prie d'agréer, Messieurs, l'expression de ma haute considération.

Guy PLUCKER.

GA/PG.v

OFFICE KIRKPATRICK Sprl.

INFORMATIQUE
INFORMATICA
24 -06- 1991

FOR PATENTS, TRADE-MARKS OR DESIGNS
IN BELGIUM, ~~FRANCE, LUXEMBURG~~
~~AND REPUBLIC OF ZAÏRE~~

POWER OF ATTORNEY

The undersigned

hereby constitute(s) and appoint(s)

Special Attorney for and in name(s) and stead to take all necessary steps to secure

In the execution of this Power the said Attorney is hereby authorized and empowered to sign and file all necessary documents, sign registers, pay and withdraw all taxes, introduce of file petitions and request for additions, improvements, extention of terms, request all proceedings, etc., obtain copies, official or not, before grant or publication, withdraw the application and refile same if necessary, elect domicile, substitute all or any part of the present power and do generally all that may be necessary or useful during the protection period; the undersigned acknowledging and ratifying all acts accomplished in connection herewith.

Signed at San Dimas, California, U.S.A.
this 31 day of May 1990

POUVOIR SPÉCIAL

La soussigné(s)e VESTAR, INC.
650 Cliffside Drive, San Dimas,
California 91773,
Etats-Unis d'Amérique

constitue(nt) pour Mandataires MM. Guy PLUCKER, GilbertADYNS, Charles DEVILLE, Frans DUYCK Daniel GRISAR, Guy MARTIN et Jean-Pierre VAN BUGGENHOUT mandataires agrées conformément à l'article 60 de la loi belge sur les brevets et ayant tous leur adresse professionnelle à
l'OFFICE KIRKPATRICK Sprl.
Square de Meêûs 4,b-1040 Bruxelles

à l'effet de me représenter dans toutes procédures relatives à la publication en Belgique d'une traduction française du brevet européen 0190050 accordé le 15 mai 1991.

En conséquence, signer, et déposer toutes pièces, signer tous registres, verser et retirer toutes taxes, présenter toutes demandes relatives à des additions, perfectionnements, prolongations ou introductions, lever toutes expéditions de titres, procès-verbaux, etc., lever des copies officielles ou autres même avant la délivrance ou la publication; retirer la demande et la représenter s'il y a lieu; élire domicile, substituer tout ou partie des présents pouvoirs et faire en général tout ce qui sera nécessaire ou utile pendant la durée de la protection, déclarant reconnaître et ratifier tous les actes accomplis pour la réalisation du présent mandat.

Fait à San Dimas
le 31 mai 1990

VESTAR, INC.

Paul Gardner Schmidt
Vice President, Research & Development

8.J25/674

Traduction du brevet européen No 190050

déposé le 30 janvier 1986

sous le No 86300641.7

accordé le 15 mai 1991

Procédé pour la préparation de petites vésicules par microémulsification

----

VESTAR, INC.

PROCEDE POUR LA PREPARATION DE PETITES VESICULES PAR MICROEMULSIFICATION

La présente invention concerne un procédé de production de petites particules micellulaires de lipides sous formes de vésicules unilamellaires en quantités commerciales par microémulsification de compositions liquides en utilisant des forces de cisaillement très élevées.

Les particules micellulaires de phospholipides unilamellaires sous forme de vésicules (également connues sous le nom de liposomes) ont reçu une attention accrue de la part des chercheurs comme supports de diverses substances, comme les agents de formation d'images et pour le diagnostic des anomalies comme les tumeurs chez l'homme en utilisant des modèles animaux. En particulier, on a montré que de petites vésicules (de moins de 200 nm) (2000 Å) peuvent être marquées pour cibler des tumeurs (Proffitt, et al., J. Nucl. Med. 24(1), p. 45-50 (1983)). Ces vésicules sont également utiles comme supports potentiels d'agents thérapeutiques pour le traitement des

tumeurs. Les petites vésicules sont également utiles pour les immunodosages *in vitro*, brevet américain n° 4 342 826 et D. Papahadjopoulos (dir. publ.) *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 308 (1978). En outre, les vésicules contenant des agents de formation d'images ou des agents thérapeutiques peuvent être modifiées par incorporation de divers dérivés d'hydrates de carbone à la surface de la vésicule pour augmenter la spécificité tissulaire des vésicules, ou en ajoutant du cholestérol afin d'accroître la stabilité des vésicules. Mauk and Gamble, *Anal. Bioc.* 84, pg. 302-307 (1979) ; Mauk, et al., *P.N.A.S. (U.S.A.)* 77(8), pg. 4430-4434 (1980) ; et *Liposome Technology, Targeted Drug Delivery and Biological Interaction*, Vol. III, G. Gregoriadis (dir. publ.), C.R.C. Press, Inc. (1984).

La technique antérieure montre que des vésicules telles que des liposomes peuvent être produites en utilisant les procédés de traitement aux ultrasons, de dialyse, d'injection ou d'évaporation à phase inversée. Ces procédés sont bien connus et peuvent se trouver dans les articles suivants : Huang, *Biochemistry* 8, pg 344 (1969) (traitement aux ultrasons) ; Rhoden and Goldin, *Biochemistry* 18, pg. 4173 (1979) (dialyse) ; et Kremer et al., *Biochemistry* 16, pg. 3932-3935 (1977) (injection) ; et *Liposome TEchnology*, Preparation of Liposomes, Vol. I, 6 Gregoriadis (dir. publ.), CRC Press Inc. (1984). Ces procédés ont en commun plusieurs inconvénients, y compris l'inaptitude à produire commodément des quantités industrielles de telles vésicules.

L'utilisation de dispositifs homogénéisants pour produire des émulsions à partir de solutions

avec des composants solubles et insolubles, est bien connue des spécialistes, brevet américain n° 4 127 332. Plusieurs de ces dispositifs d'homogénéisation fonctionnent en créant des forces de cisaillement pour disperser les composants insolubles et solubles. Ces forces de cisaillement résultent du procédé connu sous le nom de cavitation qui comporte la formation rapide de bulles dans la solution échantillon lorsqu'elle passe à travers des canaux étroits, provoquant une réduction de la pression de vapeur du fluide. Les bulles s'effondrent alors et la solution sort de ces zones de canaux, générant une force de cisaillement. Cependant, on a fait fonctionner de tels dispositifs d'homogénéisation à des pressions relativement faibles (généralement en dessous de 69 MPa (10 000 psi) dans le but de créer des émulsions ayant de grandes particules (plus de 1 µm) comme les lipoprotéines utilisées dans la boulangerie (brevet américain n° 4 360 537), ou simplement pour former une émulsion d'huile et d'eau, brevet américain n° 4 026 817.

Récemment, on a employé divers dispositifs mécaniques comme des homogénéiseurs pour produire des vésicules, brevet américain n° 4 411 894. Cependant, ces dispositifs ont été utilisés pour aider à la dispersion initiale de substances précurseurs des vésicules comme la lécithine de soja ou d'oeuf, qui ne nécessitent pas de forces de cisaillement élevées pour former des vésicules et qui ne forment pas de vésicules ayant une stabilité optimale <u>in vivo</u>. En outre, on a utilisé le dispositif "Press and Pressure Cell" de French pour générer de petites vésicules, brevet américain n° 4 263 428. Un incon-

vénient de ce dispositif est qu'il nécessite un délai supplémentaire pour recharger un échantillon car il ne fournit pas de moyen pour recycler la solution lipidique à travers le dispositif.

L'invention a donc pour objet de fournir un procédé efficace, rapide et reproductible ayant les avantages énumérés ci-dessus pour produire des quantités industrielles de petites vésicules unilamellaires, en particulier des vésicules appropriées pour le traitement et le diagnostic des tumeurs dans le corps.

L'invention comprend un procédé de production de petites (moins de 200 nm) (2000 Å) vésicules unilamellaires en quantités industrielles dans lequel on met en suspension une solution contenant des lipides et d'autres composants capables de former les vésicules désirées dans un appareil d'homogénéisation modifié, on les maintient à une température sélectionnée, et on les y soumet à des forces de cisaillement très élevées, pendant une durée sélectionnée.

Le procédé de l'invention comprend en outre un procédé de préparation de petites (moins de 200 nm) (2000 Å) vésicules lipidiques unilamellaires appropriées pour l'utilisation comme supports d'agents de formation d'images pour cibler des cellules tumorales dans le corps. On prépare ces vésicules en mettant une solution de composants capables de former des vésicules, un ionophore, un agent de chélation et, dans certaines applications, un traceur radioactif lié audit agent de chélation, dans un appareil d'homogénéisation et en soumettant la solution à des forces de cisaillement très élevées, tout en maintenant la solution

à une température choisie, pendant une durée choisie.

L'invention comprend également un procédé de préparation de petites (moins de 200 nm) (2000 Å) vésicules unilamellaires appropriées pour utilisation comme supports d'agents thérapeutiques pour traiter les tumeurs dans le corps. On obtient ces vésicules en mettant une solution de composants capables de former des vésicules, un agent thérapeutique et, dans certaines applications, un ionophore, un agent de chélation et un traceur radioactif lié audit agent de chélation, dans un appareil d'homogénéisation et en soumettant cette solution à des forces de cisaillement très élevées tout en maintenant la solution à une température sélectionnée, pendant une durée sélectionnée.

L'invention fournit un procédé pour la préparation de petites vésicules unilamellaires d'un diamètre inférieur à 2000 Å (200 nm) appropriées aux applications biologiques dans lequel:

(a) on hydrate des molécules amphiphiles qui sont des phospholipides ou des phosphoglycérides ayant des chaînes hydrocarbonées d'au moins 16 atomes de carbone, et éventuellement d'autres composants capables de former des vésicules lipidiques qui sont stables in vivo ;

(b) on disperse ledit lipide hydraté dans un appareil homogénéisant ayant un moyen de recyclage à une pression de 55 à 90 MPa (8000 à 13000 p.s.i.) et à une température de 50°C à 80°C pour générer une micro-

émulsion contenant de petites vésicules lipidiques unilamellaires de moins de 200 nm (2000 Å) ; et

(c) on sépare lesdites petites vésicules unilamellaires de toute matière non-encapsulée.

Le procédé de l'invention commence avec la préparation d'une solution de matières capables de former des vésicules. De préférence, les liquides pour utilisation dans l'invention sont des phospholipides et peuvent comprendre la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), la distéaroyl phosphatidylcholine (DSPC) ou des matières analogues.

On peut également utiliser des molécules amphiphiles autres que les phospholipides tels que les phosphoglycérides. Voir d'une manière générale The Hydrophobic Effect par Charles Tanford, Wiley-Interscience, (1980), Biological Lipids, (Ch. 11) pg. 106-109. Il est préférable d'utiliser des composés ayant des chaînes hydrocarbonées qui présentent des transitions de phases à des températures relativement élevées (supérieures à 37°C) pour former des vésicules ayant une stabilité accrue in vivo. On sait que les points de transition de phase sont fonction de la longueur de la chaîne hydrocarbonée, The Hydrophobic Effect, Charles Tanford, (2e Ed. 1980). Ainsi, les composés formant vésicules ayant des chaînes carbonées d'au moins 16 atomes de carbone sont préférables. Cependant, il est plus difficile de réaliser la formation de vésicules avec de telles chaînes hydrocarbonées plus longues.

On a trouvé ici de façon surprenante que l'utilisation d'un appareil homogénéisant que l'on

fait fonctionner à des pressions supérieures aux pressions spécifiées, et équipé d'un réservoir capable de maintenir des températures sélectionnées, peut convertir de tels composés hydrocarbonés à longue chaîne en vésicules améliorées qui peuvent ainsi être produites à des quantités industrielles.

On peut incorporer du cholestérol dans la solution lipidique pour accroître la stabilité des vésicules que l'on prépare en utilisant les procédés ici décrits. En outre, si les vésicules sont utilisées pour porter des agents de formation d'images afin de localiser et de diagnostiquer des tumeurs, on peut ajouter un composé de chélation à la solution lipidique pour qu'il soit piégé dans les vésicules, ainsi qu'un ionophore pour charger des cations externes aux fins de radiomarquage dans l'agent de chélation à l'intérieur des vésicules. La formation d'images s'effectue en utilisant une caméra gamma. L'ionophore préféré est A23187, mais d'autres ionophores utiles comprennent les polyesters tels que le lasalocide A(X-537A) et les dérivés 5-bromo du lasolocide ; les depsipeptides cycliques comme la beauvéricine ; les peptides cycliques comme la valinomyline ; et les toxines antifongiques comme l'arénaciolide. L'agent de chélation est de préférence l'acide nitriloacétique (NTA), bien qu'on puisse également utiliser d'autres chélateurs. Par exemple, lorsque les cations sont des ions métalliques polyvalents, on peut employer des chélateurs acide polyaminocarboxylique pour de tels ions, comme l'acide éthylènediamine tétraacétique, l'acide diéthylènetriamine pentaacétique, l'acide diamino-cyclohexanetétraacétique et l'acide imino-diacétique. D'autres

agents utiles pour donner une image de tumeurs peuvent inclure les agents de contraste pour les images par rayons X comme les sels diatrizoïques, par exemple l'Hypaque® méglumine, ou des agents de formation d'images par résonance magnétique nucléaire (RMN) comme les ions paramagnétiques et leurs complexes avec des agents de chélation forts, par exemple le Gadolinium-DTPA.

L'invention envisage également l'utilisation de vésicules pour porter des agents thérapeutiques afin de traiter des anomalies telles que les tumeurs chez un malade. On peut attacher des agents chimio-thérapeutiques tels que les antibiotiques (y compris la daunomycine, la bléomycine, l'adriamycine, l'actinomycine D, la mytomycine (ou la mithramycine), des agents alcoylants (y compris le chlorambucil, le cyclophosphamide ou la triéthylènemélamine) ou des antimétabolites (y compris le méthotréxate, le 5-fluorouracil, la 6-mercaptopurine, l'arabinosyl-adénine ou l'arabinosylcytosine) peuvent être attachés aux vésicules pendant le procédé de microencapsulation de l'invention. On peut également attacher des agents radiothérapeutiques, y compris des radionucléides tels que l'iode 131, l'yttrium 90 ou le phosphore 32 aux vésicules produites, en utilisant les procédés ici décrits, pour la radiothérapie des tumeurs.

L'invention nécessite l'utilisation d'un appareil homogénéisant capable de fonctionner à des pressions élevées pour générer les forces de cisaillement localisées très élevées nécessaires pour produire la microémulsion de petites vésicules lipidiques unilamellaires à partir des solutions de matières

formant vésicules ici décrites. Un tel appareil est un homogénéiseur Gaulin modifié (Modèle 15M) qui accomplit la dispersion de la solution lipidique au moyen d'une soupape d'homogénéisation. La spécification de l'homogénéiseur prescrit une pression de fonctionnement continu de 55 MPa (8000 p.s.i.) ou une pression de fonctionnement intermittent de 69 MPa (10 000 p.s.i.). On a trouvé, cependant, qu'avec des mesures de sécurité appropriées, l'homogénéiseur peut fonctionner pendant de courtes durées à une pression allant jusqu'à 83 MPa (12 000 p.s.i.) ou même 90 MPa (13 000 p.s.i.). Dans le mode de réalisation préféré, l'homogénéiseur recycle la solution à travers la soupape d'homogénéisation à raison de 1 litre par minute.

L'homogénéiseur Gaulin est modifié avec deux réservoirs d'échange de chaleur maintenus à 5-10°C et 80°C et équipés d'une boucle de rétroaction pour aider à transformer les composants formateurs de vésicules hydrocarbonés à chaîne plus longue en vésicules. Lorsqu'on utilise des températures plus élevées dans les réservoirs échangeurs de chaleur, il est possible d'utiliser une gamme de pression plus étendue pour obtenir des vésicules ayant la dimension désirée. Puisque la température réelle de la solution lipidique est de quelques degrés supérieurs dans la zone de la soupape d'homogénéisation où sont générées les forces de cisaillement, il est déconseillé aux températures du réservoir élevées d'utiliser des pressions élevées car celles-ci risquent d'augmenter davantage la température de la solution dans la zone de la soupape de dispersion. Cette température de fonctionnement élevée permet ainsi de baisser la pression et de produire cependant des vésicules ayant les dimensions désirées destinées à différentes applications biologiques.

Comme on l'a noté ci-dessus, cet effet est probablement dû à la facilité accrue de transformation de molécules amphiphiles hydrocarbonées à grande chaîne en vésicules de température supérieure à leurs points de transition de phase.

L'invention utilise également un instrument de détermination des tailles particulaires à laser Nicomp 200 qui détermine la distribution des tailles particulaires dans une solution en utilisant les principes de la dispersion dynamique de la lumière. En bref, on fait passer un rayon laser à travers une solution échantillon de vésicules et on détermine la taille particulaire à partir du comportement dans le temps des fluctuations d'intensité lumineuse dispersée en utilisant une série de calculs en fonction du temps exprimés sous forme de fonctions d'auto-corrélation. On calcule le rayon hydrodynamique (Rh) des particules par la relation de Stokes-Einstein en utilisant l'analyse des moindres carrés. On obtient le rayon moyen et la variation de la distribution de tailles particulaires produites par l'appareil Nicomp à partir d'un échantillon en supposant que la distribution est de forme gaussienne. Cependant, lorsqu'il existe une distribution de tailles particulaire bimodale, cette hypothèse n'est pas appropriée et les fabricants de l'appareil Nicomp ont fourni des programmes instrumentaux déposés qui permettent d'assigner aux données des échantillons des données bimodales afin d'obtenir le diamètre moyen (en fonction de Rh) pour les particules dans une telle distribution. On a obtenu une distribution de tailles bimodale pour les vésicules préparées par les procédés de

l'invention. En utilisant le programme d'adaptation des données vendu par les fabricants de l'appareil Nicomp (Santa Barbara, Californie), on a obtenu les valeurs du diamètre moyen (Stokes-Einstein (Rh x 2)) des vésicules dans un échantillon. En outre, l'examen microscopique des vésicules dans plusieurs échantillons que l'on a fait passer à travers l'instrument de détermination de la taille Nicomp, a révélé que les diamètres d'une majorité de vésicules tombent en fait à l'intérieur du pic principal de la courbe de distribution de tailles bimodale obtenue à partir de l'appareil Nicomp. Ainsi, pour les données concernant les tailles représentées dans les exemples, les diamètres des vésicules dans un échantillon donné préparé par les procédés de l'invention sont donnés à la fois sous la forme de la moyenne de Stokes-Einstein et des diamètres principaux moyens des vésicules des pics.

Pour obtenir une explication plus détaillée de la dispersion dynamique de la lumière, on se réfèrera à B. Chu, Laser Light Scattering, Academic Press, N.Y. (1974), et aux instructions accompagnant l'appareil de détermination des tailles Nicomp.

Les exemples suivants sont présentés afin de préciser l'invention. Dans les exemples, on se réfère aux figures 1, 2 et 3 des dessins et aux tableaux I-III.

La figure 1 est une vue antérieure d'un appareil d'homogénéisation de Gaulin modifié.

La figure 2 est une vue latérale d'un appareil d'homogénéisation de Gaulin modifié.

La figure 3 est une coupe de l'assemblage de soupape d'homogénéisation prise selon la ligne 3-3 de la figure 2.

EXEMPLE I

PREPARATION D'UNE SOLUTION DE VESICULES

On prépare des solutions de vésicules en utilisant les techniques décrites par Mauk et al., Anal. Bioc. 94 pg. 302-307 (1979), et exposées dans le brevet américain n° 4 310 506. En bref, on utilise de la L-α-distéaroyl-phosphatidylcholine (DSPC) de Calbiochem comme composant phospholipidique de la solution de vésicules sans autre purification. On achète le cholestérol (CH) auprès de Sigma, et le sel trisodique de l'acide nitriloacétique (NTA) auprès d'Aldrich Chemical Co. L'ionophore, A23187 est obtenu auprès de Eli Lilly and Co. ; sa préparation est décrite dans le brevet américain n° 3 960 667.

Pour cet exemple, on utilise la DSPC et le cholestérol dans un rapport molaire de 2:1 (5 g de lipide total, DSPC et CH) et on les dissout dans 50 ml de chloroforme, puis on sèche pour obtenir une pellicule dans un évaporateur rotatif. On sèche la pellicule sous vide pendant la nuit et on la réhydrate avec 0,5 l de sel physiologique tamponné au phosphate (P_i/NaCl: NaCl à 0,9%/phosphate de sodium 5 mM à un pH de 7,4). La concentration en lipide total est d'environ 10 mg/ml de lipide total.

On utilise un homogénéiseur Gaulin modifié, Modèle 15M, tel que présenté dans les figures 1 et 2, pour réaliser la microémulsification de la solution lipidique. L'homogénéiseur consiste en une transmission, (4), une vis d'ajustement de la pression (5), un manomètre (6), une bouche de recyclage (7) et un assemblage de soupapes d'homogénéisation (8).

La modification consiste en deux réservoirs échangeurs de chaleur (9) et (10) qui maintiennent la solution lipidique à une température choisie dans un intervalle de 40-80°C, selon la pression à laquelle on traite l'échantillon, mais de préférence entre 70 et 75°C. Un réservoir (9) de la figure 2, est maintenu dans un intervalle de 5-10°C, l'autre réservoir, (10) de la figure 2 est maintenu à environ 80°C.

Au fonctionnement, la solution lipidique préparée comme ci-dessus est mise dans le réceptacle de solution (11) de la figure 1, puis déplacée dans la zone de soupape (12) de la figure 3 à pression élevée et faible vitesse. Des bulles de vapeur se forment dans la solution à la suite de l'augmentation rapide de vitesse accompagnée par une diminution de la pression au fur et à mesure que la solution se déplace à travers le canal (13) entre la soupape (14) et le siège de soupape (15). Les bulles de vapeur implosent alors au moment où la solution sort de la zone de soupape (12) à une vitesse abaissée et à une pression accrue. Ce procédé de formation et d'implosion des bulles (également connu sous le nom de cavitation) génère les forces de cisaillement élevées qui microémulsifient la solution lipidique. La microémulsion sort alors de la zone de soupape (12), frappe l'anneau d'impact (16) et est recyclée à travers l'homogénéiseur.

Il est préférable que l'appareil d'homogénéisation fonctionne pendant une durée suffisante pour permettre un certain nombre de recyclages de la solution lipidique tout entière à travers la zone de soupape d'homogénéisation (12 de la figure 3) pour obtenir une microémulsification optimale. En tenant compte du volume (0,5 litre)

et du débit (un litre par minute) de l'appareil d'homogénéisation Gaulin modifié utilisé dans cet exemple, on trouve qu'au moins 20 circulations (correspondant à environ 10 minutes) mais au plus 200 circulations (100 minutes) suffisent pour produire une microémulsion de petites vésicules appropriées pour les applications biologiques.

Dans cet exemple, on fait passer les compositions de vésicules à travers l'homogénéiseur à des températures choisies dans un intervalle de 50-80°C pendant des durées allant de 15 à 90 minutes. La pression pour chaque opération varie entre 55 MPa et 83 MPa (8000 p.s.i. à 12000 p.s.i.).

Après chaque opération, on détermine la taille des vésicules dans la microémulsion.

DETERMINATION DE LA TAILLE DES VESICULES

On centrifuge environ 1 millilitre de la suspension de vésicules homogénéisée à 15 000 tpm pendant 10 minutes en utilisant une microcentrifugeuse Eppendorf Modèle 5414. Les grandes particules qui feraient apparaître une erreur dans la mesure de dispersion de la lumière sont tirées vers le fond tandis que les vésicules restent en suspension. On rince un tube à essais de 6 x 50 mm avec du STP (sel physiologique tamponné au phosphate) filtré, puis on le remplit jusqu'à 5 mm du sommet avec du STP. On met alors 3-4 µl des vésicules centrifugées dans le tube à essais et on mélange le contenu en renversant le tube plusieurs fois. On utilise un instrument de détermination des particules à laser Nicomp 200 pour déterminer le diamètre moyen et le diamètre des pics principaux comme il est dit ci-

dessus pour un échantillon de vésicules. L'utilisation de l'appareil de détermination de la taille des particules Nicomp est décrite dans le manuel d'instructions. La température est réglée à 20°C. On choisit une largeur de canal appropriée (de préférence 1,4El m sec) et un facteur de prégraduation (de préférence 1). On fait alors passer l'échantillon à travers l'appareil Nicomp. Au bout de 50 000 coups, on obtient une estimation raisonnable de la taille particulaire.

Le tableau I montre les données de tailles des vésicules résumées pour les vésicules préparées par les procédés de microémulsification décrits dans le présent exemple à différentes pressions pendant des durées différentes et à des températures de réservoirs allant de 50° à 80°C.

TABLEAU I

Temp (°C)	Pression MPa (PSI)	Taille (nm) *Diamètre moyen de pic principal des vésicules	Taille (nm) Diamètre de Stokes-Einstein moyen	Durée d'homogénéisation (min.)
50-55	76(11000)	67	102	15
50-55	76(11000)	61	99	30
50-55	76(11000)	57	100	60
50-55	76(11000)	57	106	75
50-55	76(11000)	56	111	90
50-55	83(12000)	59	97	15
50-55	83(12000)	55	94	30
50-55	83(12000)	51	90	60
50-55	83(12000)	47	87	75
70-75	76(11000)	63	122	15
70-75	76(11000)	57	116	30
70-75	76(11000)	52	107	60
70-75	76(11000)	50	83	75
70-75	76(11000)	51	88	90
70-75	55(8000)	57	103	15
70-75	55(8000)	59	100	30
70-75	55(8000)	54	89	60
70-75	55(8000)	52	88	75
70-75	55(8000)	52	84	90

Les données du tableau I montrent que l'on obtient de petites vésicules lipidiques (moins de 200 nm) (2000 Å) par une microémulsification en utilisant les forces de cisaillement élevées générées dans l'homogénéiseur fonctionnant à pression élevée. A la faible température de réservoir (50-55°C), de petites vésicules sont générées de façon reproductible à des pressions plus élevées (supérieures à 69 MPa (10 000 p.s.i.). On obtient de préférence des vésicules par microémulsification à la température de réservoir plus élevée (70-75°C) qui génère de petites vésicules appropriées à des pressions supérieures à 55 MPa (8000 p.s.i.). Cet effet de température élevée permet donc d'utiliser un plus grand intervalle de pressions qui peuvent être une fonction de la difficulté de transformer des hydrocarbures à longue chaîne en vésicules étant donné les points de transition de phase plus élevés. Une température réduite nécessite un fonctionnement de l'appareil d'homogénéisation à des pressions plus élevées pour générer des forces de cisaillement suffisantes pour transformer de tels précurseurs de vésicules en vésicules.

Ces vésicules sont utiles pour diverses applications biologiques, comme le diagnostic et le traitement de tumeurs et les dosages *in vitro*.

EXEMPLE II

PREPARATION DE VESICULES MODIFIEES POUR REALISER DES IMAGES DE TUMEURS

On prépare des solutions de vésicules comme dans l'exemple I avec les modifications suivantes : on ajoute l'ionophore A23187 au mélange DSPC:CH pour donner un rapport molaire de DSPC,CH,A23187

de 2:1:0,004 (5 g de lipide total, DSPC et CH) en utilisant les procédés décrits dans les brevets américains Nos 4 310 506, 3 960 667 et dans Mauk et al., P.N.A.S., U.S.A., 76 (2) 765-769 (1979). A23187 permet le chargement de vésicules lipidiques avec un cation de radiomarquage tel que $^{111}In^{3+}$. L'inclusion de faibles quantités d'A23187 ne gêne pas la formation de vésicules unilamellaires par le procédé de microémulsification.

On dissout les composants DSPC, CH et A23187 dans 50 ml de chloroforme et on sèche pour obtenir une mince pellicule lipidique comme ci-dessus. On réhydrate alors la pellicule lipidique séchée avec une solution de STP de 0,5 litre contenant le chélateur faible NTA (1 mM), à pH 7,4. La concentration de lipides totaux est d'environ 25 mg/ml. Comme il est dit dans le brevet américain n° 4 310 506 et Mauk, et al., P.N.A.S. USA 76 (2), pg. 765-769 (1979), le NTA assure la force de poussée pour le transfert net de cations en vue du radiomarquage dans les vésicules. Bien que le NTA soit le chélateur préféré comme il est dit ci-dessus, on peut utiliser d'autres chélateurs. En outre, tandis que $^{111}In^{3+}$ est le cation préféré pour radiomarquer les vésicules aux fins d'études de biodistribution et de procédés de diagnostic, on peut utiliser n'importe quel cation qui peut être lié à un agent de chélation. Les cations sont de préférence choisis dans le groupe de marqueurs radioactifs, par exemple ^{111}In, ^{45}Ca, ^{51}Cr, ^{99}Tc, ^{67}Ga, ^{57}Co et ^{65}Zn.

Après réhydratation avec le NTA dans le STP, on microémulsifie le mélange dans un homogénéiseur

Gaulin modifié, comme il est dit dans l'exemple I. On utilise un intervalle de réglage de durée et de pression tel que décrit dans l'exemple I. On trouve que les paramètres préférés pour produire de petites vésicules appropriées pour les biodistributions de cet exemple sont une microémulsification pendant 60 minutes à 69 MPa (10 000 p.s.i.) avec une température de solution de 70°C.

On filtre alors la microémulsion obtenue par des techniques standards de filtration sur gel pour séparer les matières particulaires plus grandes et l'excès de NTA (non encapsulé) d'avec les petites vésicules encapsulant le NTA. On concentre alors les petites vésicules en utilisant un appareil de concentration à fibre creuse Amicon et on détermine la concentration de lipides totaux en utilisant un dosage au phosphate. On utilise alors du STP pour diluer les vésicules à une concentration lipidique totale finale de 25 mg/ml.

CHARGEMENT

On charge alors les vésicules avec $^{111}In^{3+}$ en utilisant les procédés décrits par Mauk & Gamble, Anal. Bioc. 94, pg. 302-307 (1979). En bref, on fait incuber 500 µl (5 mg de lipide) de vésicules et 35 µl d'$InCl_3$ 3,4 µm dans du citrate de sodium 104 mM (pH 7,4), et 1-50 µl de $^{111}In^{3+}$ selon l'activité requise. On inclut dans le mélange d'incubation un volume de 2 x STP égal à celui de l'addition de $^{111}In^{3+}$. On réalise la charge maximale en faisant incuber à 80°C.

On analyse les vésicules pour déterminer si elles conviennent pour les études de biodistribution

et de ciblage par comparaison avec des vésicules obtenues par traitement aux ultrasons. On prépare des vésicules traitées aux ultrasons comme il est dit par Mauk & Gamble, Anal. Bio. 94, pg 302-307 (1979) et le brevet américain n° 4 310 506. En bref, on sèche une solution lipidique de la même composition que celle présentée ci-dessus pour l'exemple I puis on la réhydrate avec 0,5 ml de NTA 1 millimolaire dans le STP. On traite le mélange aux ultrasons dans un bain d'eau à température ambiante pendant 10 minutes, puis on le fait incuber à 60°C pendant 10 minutes pour éliminer par recuit les défauts structuraux éventuels. On centrifuge alors les vésicules à faible vitesse pour enlever le titane et toute matière fortement agglutinée éventuellement présente. On enlève le NTA qui ne s'incorpore pas en faisant passer la préparation sur une colonne de Sephadex®G-50 équilibrée avec STP. On caractérise alors les vésicules comme il est dit ci-dessous.

DETERMINATION DE LA TAILLE DES VESICULES

On procède à la détermination de la taille les vésicules produites par le procédé de cet exemple comme il est dit pour l'exemple I en utilisant l'instrument de détermination de tailles Nicomp et on compare avec des résultats obtenus en produisant des vésicules traitées aux ultrasons. Comme on le voit au tableau II, les procédés de l'invention donnent des vésicules ayant des tailles situées dans un intervalle de 40-100 nm (400 Å - 1000 Å) comparables aux tailles de vésicules par ultrasons et l'inventeur trouve que ces procédés conviennent pour utilisation dans les études de biodistribution et de ciblage.

TABLEAU II

Caractéristiques des vésicules microémulsifiées par opposition aux vésicules traitées aux ultrasons

	Taille (nm)		Efficacité de la charge avec $^{111}In^{3+}$
	Diamètre Stokes-Einstein (Rh x 2)	Diamètre de pic moyen	
1. micro-émulsifié	87	66	80,1%
2. traité aux ultrasons	83	51	83,1%

EFFICACITE DE LA CHARGE

On détermine l'efficacité de la charge de $^{111}In^{3+}$ dans les vésicules comme suit : on ajoute 100 µl de préparation de vésicules avec $^{111}In^{3+}$ chargées comme il est dit ci-dessus à 0,5 g de Chelex® (Dow Chemical Corp.) humidifié, préalablement ajusté à pH 7,4, et on mélange pendant 2 minutes. On ajoute 900 µl de STP et on centrifuge le mélange dans une centrifugeuse de table pendant 5 minutes à la température ambiante. On enlève 500 µl de surnageant et on détermine l'efficacité de la charge (pourcentage de vésicules chargées) en comptant dans un compteur Gamma la radioactivité de l'échantillon de 500 µl divisée par la radioactivité des

100 µl de préparation vésiculaire d'origine et en multipliant par 200.

Comme il est indiqué au tableau II, on trouve que l'efficacité de la charge du cation $^{111}In^{3+}$ dans les vésicules produites par micro-émulsification est supérieure à 80%, ce qui est comparable aux valeurs antérieurement obtenues pour les vésicules chargées avec $^{111}In^{3+}$ préparées par traitement aux ultrasons. Mauk & Gamble, Anal. Bioc. 94, pg 302-307 (1979).

BIODISTRIBUTION

Pour explorer le caractère approprié des vésicules obtenues dans cet exemple, aux fins d'utilisation *in vivo*, on administre des vésicules contenant le marqueur radioactif $^{111}In^{3+}$ à des souris femelles BALB/C auxquelles on a implanté au préalable par voie sous-cutanée dans la cuisse droite des tumeurs EMT 6 neuf à dix jours avant le début de ces expériences pour permettre l'analyse de la biodistribution des vésicules dans le tissu animal.

On effectue une injection intraveineuse par une veine caudale latérale. On pèse alors toutes les souris et on les loge pendant 24 heures. Avant de les sacrifier, on anesthésie les souris avec de l'éther et on prélève de 1/2 à 1 millilitre de sang par l'orbite et on le met dans un tube de décompte Gamma Beckman Gamma Counter 5500. On sacrifie alors les souris par dislocation cervicale et on dissèque les échantillons suivants : tumeur, poumon, foie, rate, rein, muscle, intestin, estomac, peau, queue et carcasse. On rince à fond ces échantillons

(sauf le muscle, l'intestin, l'estomac, la peau, la queue et la carcasse) dans le STP et on les met dans les tubes de décompte Gamma et on pèse. On compte tous les échantillons dans le compteur Gamma pendant une minute pour calculer le pourcentage de dose injectée (radioactivité) par gramme pour chaque tissu. On compte deux standards de vésicules avec les échantillons de tissus.

Les résultats de la biodistribution des vésicules radiomarquées préparées par microémulsification à 69 MPa (10 000 p.s.i.) (à des températures de 70-75°C) sont résumés au tableau III. Le tableau III compare également ces résultats avec les données obtenues pour la biodistribution des vésicules préparées par traitement avec les ultrasons et marquées avec $^{111}In^{3+}$.

TABLEAU III

DISTRIBUTION BIOLOGIQUE DES VESICULES

moyenne en pourcentage de dose injectée/
g de tissu pour 5 souris

TISSU	VESICULES MICROEMULSIFIEES	VESICULES TRAITEES AUX ULTRASONS
1. sang	8,1	10,4
2. tumeur	34,0	34,0
3. poumon	5,3	6,2
4. foie	19,8	18,4
5. rate	26,2	25,1
6. rein	10,6	9,2
7. muscle	1,2	0,8
8. intestin	4,1	3,1
9. estomac	2,3	2,5
10. peau	3,3	3,7
11. queue	2,6	2,0
12. carcasse 1-3	1,7	1,5

On trouve ainsi que les distributions tissulaires sont comparables pour les vésicules microémulsifiées et traitées aux ultrasons.

Ces résultats montrent que les vésicules produites par le procédé de microémulsion ici décrit possèdent des attributs de taille et de stabilité comparables à ceux des vésicules produites par traitement aux ultrasons et qu'elles conviennent pour utilisation *in vivo* afin de cibler les tumeurs dans des buts de diagnostic et de traitement, ainsi que d'autres applications biologiques comme les biodosages *in vitro*.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la préparation de petites vésicules unilamellaires d'un diamètre inférieur à 200 nm (2000 Å) appropriées pour les applications biologiques, dans lequel:

(a) on hydrate des molécules amphiphiles qui sont des phospholipides ou des phosphoglycérides ayant des chaînes hydrocarbonées d'au moins 16 atomes de carbone, et éventuellement d'autres composants capables de former des vésicules lipidiques qui sont stables <u>in vivo</u>;

(b) on disperse ledit lipide hydraté dans un appareil d'homogénéisation ayant un moyen de recirculation à une pression de 55 à 90 MPa(8.000 à 13.000 p.s.i) et à une température de 50°C à 80°C pour générer une microémulsion contenant de petits vésicules lipidiques unilamellaires de moins de 200 nm(2000 Å); et

(c) on sépare lesdites petites vésicules unilamellaires de toute matière éventuellement non-encapsulée.

2. Procédé selon la revendication 1 dans lequel les molécules amphiphiles et autres composants capables de former des vésicules lipidiques comprennent un phospholipide et du cholestérol dans un rapport molaire de 2 à 1.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 dans lequel la concentration finale de lipide total dans la micro-émulsion est de 10 mg/ml.

4. Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'étape (a) comprend:

(a) (i) la dissolution desdites molécules amphiphiles et d'autres composants capables de former des vésicules lipidiques dans une solution de solvant organique;

(a) (ii) la dessication de ladite solution en une pellicule lipidique; et
(a) (iii) la réhydratation de la pellicule lipidique séchée.

5. Procédé selon la revendication 4 pour la préparation de vésicules appropriées pour une utilisation dans le ciblage des tumeurs corporelles aux fins de localisation et de diagnostic des tumeurs, dans lequel:
dans l'étape (a) (i), on dissout les molécules amphiphiles et au moins un autre composant, y compris un ionophore;
dans l'étape (a) (iii), on réhydrate la pellicule lipidique séchée avec une solution physiologique de sel tamponnée au phosphate contenant un agent de chélation faible;
dans l'étape (b), on disperse ledit lipide réhydraté pour générer une microémulsion contenant des vésicules lipidiques avec l'ionophore incorporé dans la bicouche lipidique et lesdites vésicules contenant l'agent de chélation;
et, après l'étape (c),
(d) on charge lesdites vésicules avec un cation radioactif pour détecter la localisation desdites vésicules lorsqu'on les administre dans un corps.

6. Procédé selon la revendication 4 pour la préparation de vésicules pour utilisation dans le traitement d'une tumeur corporelle, dans lequel :
dans l'étape (a) (iii), on réhydrate la pellicule lipidique séchée avec une solution contenant un agent thérapeutique; et
dans l'étape (b) on disperse ledit lipide hydraté pour générer une microémulsion contenant des vésicules lipidiques contenant l'agent thérapeutique.

7. Procédé selon la revendication 4, 5 ou 6 dans lequel ledit solvant organique est un éther, le chloroforme ou un alcool.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel on conduit ladite étape de dispersion dans un appareil d'homogénéisation dans lequel ladite solution lipidique peut être maintenue dans un intervalle de température séléctionné.

9. Procédé selon la revendication 8 dans lequel ledit appareil comprend un réservoir d'échange de chaleur.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans lequel on conduit ladite étape de dispersion en faisant fonctionner ledit appareil d'homogénéisation à une pression de 55 à 83 MPa (8.000 à 12.000 p.s.i) et à une température de solution maintenue entre 50° et 80°C pendant une durée allant de 15 à 90 minutes.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lequel on conduit ladite étape de dispersion en faisant fonctionner ledit appareil d'homogénéisation à une pression de 55 à 69 MPa (8.000 à 10.000 p.s.i) et à une température de réservoir de 70-75°C pendant environ 60 minutes.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lequel on conduit ladite étape de dispersion en faisant fonctionner l'appareil d'homogénéisation à une pression de 69 à 83 MPa (10.000 à 12.000 p.s.i) et à une température de réservoir de 50-55°C pendant environ 60 minutes.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 dans lequel on conduit ladite étape de dispersion en faisant fonctionner ledit appareil d'homogénéisation à une pression d'environ 69 MPa (10.000 p.s.i) et à une température de réservoir de 70°-75°C pendant environ 60 minutes.

14. Procédé selon la revendication 1 ou 6 dans lequel lesdites molécules amphiphiles sont des phospholipides qui sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine ou la phosphatidylsérine.

15. Procédé selon la revendication 1 ou 5 dans lequel le phospholipide est la distéaroyl-phosphatidylcholine et/ou la dipalmitoyl-phosphatidylcholine.

16. Procédé selon la revendication 15 lorsqu'elle se rattache à la revendication 5 dans lequel lesdites molécules amphiphiles sont des phospholipides et lesdits autres composants capables de former des vésicules comprennent du cholestérol et un ionophore.

17. Procédé selon la revendication 16 dans lequel la composition des vésicules comprend un phospholipide, du cholestérol et un ionophore dans un rapport molaire de 1:2:0,004.

18. Procédé selon la revendication 16 ou 17 dans lequel l'ionophore est le A23187.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5, 16, 17 ou 18 dans lequel l'agent de chélation est l'acide nitriloacétique.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5, 16, 17, 18 ou 19 dans lequel le cation radioactif est $^{111}In^{3+}$.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 ou 16 à 20 dans lequel la concentration finale de lipide total dans la microémulsion est de 25 mg/ml.

22. Procédé selon la revendication 6 dans lequel le phospholipide est la distéaroyl-phosphatidylcholine.

23. Procédé selon la revendication 6 ou 22 dans lequel ladite étape de dissolution de substances lipidiques dans un solvant organique comprend en outre l'addition de cholestérol.

24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6, 22 ou 23 dans lequel la composition des vésicules comprend un phospholipide, du cholestérol et un agent thérapeutique, ledit agent thérapeutique étant contenu dans la solution utilisée pour hydrater les molécules amphiphiles.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 22 à 24 dans lequel ledit agent thérapeutique est un agent chimiothérapeutique.

26. Procédé selon la revendication 25 dans lequel ledit agent chimiothérapeutique est un antibiotique qui comprend la Daunomycine, la Bléomycine, l'Adriamycine, l'Actinomycine D, la Mytomycine C ou la Mithramycine.

27. Procédé selon la revendication 25 dans lequel ledit agent chimiothérapeutique est un agent alcoylant comprenant le chlorambucil, le cyclophosphamide ou la triéthylène-mélamine.

28. Procédé selon la revendication 25 dans lequel ledit agent chimiothérapeutique est un antimétabolite comprenant le méthotrexate, le fluoro-5-uracile, la mercapto-6-purine ou l'arabinosylcytosine.

29. Procédé selon la revendication 25 dans lequel ledit agent chimiothérapeutique est le méthotrexate.

30. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 22 à 24 dans lequel ledit agent thérapeutique est un agent radiothérapeutique.

31. Procédé selon la revendication 30 dans lequel ledit agent radiothérapeutique est un radionuclide qui comprend l'iode 131, l'yttrium 90 ou le phosphore 32.